

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Melissa Stanford, a translator with Chillson Translating Service, 3530 Chas Drive, Hampstead, Maryland, 21074, hereby declare as follows:

That I am familiar with the German and English languages;

That I am capable of translating from German to English;

That the translation attached hereto is a true and accurate translation of German Application 199 47 559.8, filed September 24, 1999, titled, "Antibody-Dye Conjugates for Angiogenesis Target Structures for Intraoperative Tumor Edge Visualization;"

That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true;

And further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any registration resulting therefrom.

By Melissa Stanford

Executed this 25 day of Sept 2002.

Witness Anne Sullivan



**FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

**Priority Certificate on the Filing of a Patent Application**

**File Number:** 199 47 559.8  
**Date of Application:** September 24, 1999  
**Applicant/Holder:** Schering Aktiengesellschaft, Berlin/DE  
**Title:** Antibody-Dye Conjugates for Angiogenesis Target Structures for  
Intraoperative Tumor Edge Visualization  
**IPC:** A 61 K, C 07 K, G 01 N

**The attached copies are a true and accurate rendition of the original documents of  
this patent application.**

Munich, September 13, 2000

**The German Patent and Trademark Office**

**The Director**

/s/

## **Antibody-Dye Conjugates for Angiogenesis Target Structures for Intraoperative Tumor Edge Visualization**

This invention relates to antibody-dye conjugates that are suitable to bind to structures of newly-formed vessels and their use for intraoperative visualization of pathological angiogenesis.

In the adult organism, no new vessel formation takes place, with few exceptions (e.g., the cycle of women of child-bearing age). The new vessel formation can be observed, however, in many diseases. The process of the new vessel formation that takes place here is referred to as angiogenesis and takes place as a response to certain signals.

Angiogenesis is a process that preferably takes place in the edge area of a focus of disease. From the center of the focus of disease, factors are released that diffuse to the edge area of the focus of disease. These factors are also referred to as angiogenesis stimulators. If these angiogenesis stimulators reach the healthy tissue in the edge area of a focus of disease, the vessels previously not integrated in the focus of disease are stimulated to form new vessel buds. The vessels that extend from these vessel buds form a new capillary vascular network in the edge area of the focus of disease. By this process, a suitable nutrient supply for the focus of disease can always be ensured. It has proven especially important that the growth of tumors and their metastases depends on the ability to induce angiogenesis.

Surgical therapy is now a standard measure for treating localized foci of disease. It has obtained great importance in the case of tumor treatment. It has turned out, however, that despite improved surgical techniques, the number of local recurrences is considerable, since the anatomical conditions in the human organism only rarely allow a large-scale removal of the focus of disease. In many organs (e.g., in the brain), large-scale removal must be eliminated to obtain healthy tissue. The risk of damaging healthy organs increases with the degree of radicalness of surgical intervention.

Histological studies of the edge area of the tumor after the completion of surgical tumor removal have shown, however, that a considerable number of tumors cannot be removed

completely, and tumor radicals remain in the body. Additional tumor growth and also tumor metastasizing can spring from these tumor radicals. A process that exactly indicates the limits of a disease process with respect to healthy tissue during surgical treatment would allow the focus of disease to be removed completely and to leave the healthy tissue unaffected to a large extent.

Dyes for the visualization of foci of disease are already known (Poon, W. S. et al., J. Neurosurgery (1992) 76: 679-686, Haglund, M. M. et al., Neurosurgery (1996) 38: 308-317). They are preferably removed directly from tumor cells or accumulate unspecifically in the extracellular space of tumors. Since the mechanism can be detected in the concentration even in healthy tissue, the specificity and sensitivity of the substances that are used is low.

Compounds that can be used for intraoperative delineation of the foci of disease by selective visualization of the edge area of a focus of disease are not known to date.

The angiogenesis preferably takes place in the edge area of foci of disease. By visualization of the angiogenesis, the limit in healthy tissue can be visualized. Antibodies for detecting angiogenesis in the focus of disease are already known and are used for visualizing newly-formed vessels in the histological tissue section, for detecting various proteins in the focus of disease or as carrier molecules for therapeutic substances.

Antibodies in combination with dyes, so-called antibody-dye conjugates, that can be used for intraoperative delineation of the focus of disease by selective visualization of the edge area of a focus of disease are not known, however.

The object of this invention is therefore to prepare antibody-dye conjugates for the intraoperative tumor edge visualization. The antibodies of the antibody-dye conjugates according to the invention are directed against structures that are specifically for the process of angiogenesis. The antibody-dye conjugates according to the invention comprise dyes that make possible an optical visualization by their concentration.

Since the angiogenesis is made most strongly in the edge area of a focus of disease, it results here in the maximum optical signal.

The antibody-dye conjugates according to the invention are thus suitable to visualize the

limits of a focus of disease, the so-called edge area, for healthy tissue by intraoperative, optical diagnosis. It is consequently made possible to remove the focus of disease completely in leaving healthy tissue largely unaffected.

Antibodies are known that are directed against molecules that are strongly expressed in angiogenetically active tissue and are expressed only to a very small level in the adjoining tissue (WO 96/01653).

Antibodies that are directed against the receptors for vascular growth factors, receptors in endothelial cells to which inflammation mediators bind, receptors in endothelial cells to which matrix molecules bind, and matrix proteins that are expressed specifically in the new vessel formation (Brekken et al., Cancer Res. (1998) 58: 1952-9 and Schold, S. C. Jr. et al., Invest. Radiol. (1993) 28: 488-96) are of special interest in antibody-dye conjugates.

Preferred are antibodies or antibody fragments that are directed against the matrix protein EDB-fibronectin. EDB-fibronectin (EDBFN), also known as oncofetal fibronectin, is a splice variant of the fibronectin, which specifically forms newly-formed vessels in the process of angiogenesis. The special advantage of antibodies against the EDB-fibronectin consists in that it does not result in any new formation of EDB-fibronectin in healthy tissue by intraoperative injury in the removal of the focus of disease. In this connection, the specificity is preserved during the surgical intervention. Antibodies against growth factor receptors or inflammation mediators in the endothelial cells, which are also expressed specifically in the tumor edge area, can be newly formed, however, during the surgical intervention even in healthy tissue near the focus of disease.

Especially preferred in the inventive antibody-dye conjugate are antibodies L19 and E8 against the EDB-fibronectin (Viti, F., et al., Cancer Res. (1999) 59: 347-352).

Such antibody-dye conjugates are also the subject matter of this invention.

The known antibodies are conjugated with dyes, whose concentration in the tissue can be optically detected and makes possible the intraoperative delineation of the edge area of a focus of disease.

The advantage of the antibody-dye conjugates according to the invention now consists in the fact that the latter can be used for a selective fluorescence staining of tissues in a neoangiogenic stage. The fluorescence staining is tumor-specific and yields a fluorescence signal that can be detected in a high signal-to-background ratio.

Antibody-dye conjugates for fluorescence imaging are also known for purposes of percutaneous, non-invasive tumor visualization (Neri, D. et al., Nature Biotechnology (1997) 15: 1271-1275).

Not known, however, are antibody-dye conjugates, which preferably accumulate in the edge area of a focus of disease.

Protein-dye conjugates for intraoperative tumor visualization are also known.

The disadvantage to these conjugates is that especially hypoxic and metabolically undernourished tumor cells take up the conjugates. Since the tissue in the edge area of tumors is well vascularized, however, and in this connection the cells are supplied adequately with oxygen and nutrients, for this very reason adequate accumulation of the known protein-dye conjugates is not possible.

The antibody-dye conjugates according to the invention are largely independent of the metabolic state of the focus of disease, however.

Although the optical detection of the limits of a focus of disease can be carried out in different ways, in general the detection of the dye-specific fluorescence radiation induced by corresponding stimulation light is preferred. Depending on the emission wavelength, in this case the fluorescence can be visually detected directly macroscopically or microscopically and optionally simultaneously recorded digitally by imaging detection systems and visualized on a display.

Fluorescence radiation of the spectral range of 400 to 650 nm is visually detectable. Especially preferred is a wavelength of 450 to 600 nm. The special advantage of the use of the visible range of light consists in the fact that the detection of fluorescence by low technical expense is possible. Stimulation light, which is produced by suitable lasers or laser diodes, is

coupled to a fiber optic light guide and is brought in by the latter to the area to be diagnosed. The implementation of the intraoperative tumor edge detection is carried out by large-scale radiation of the area. The reflected stimulation light is blocked by a filter (e.g., a pair of filtering glasses that are worn by the person making the study), and only the dye-specific fluorescence is observed (macroscopic observation). As an alternative, the detection of the fluorescence can be carried out by an operating microscope (microscopic observation). By the small penetration depth of VIS light in the tissue (a few millimeters), new vascular formations located on the surface can be detected in this way.

Another advantage of the spectral range of visible light exists in the small penetration depth in the tissue and emission from the tissue. The detectable signal consequently is not distorted by signals from deeper portions of tissue and can be assigned specifically to the tissue structures that are visible on the surface.

The subjects of this invention are thus also antibody-dye conjugates, whose dyes induce an optical signal in the visible spectral range of the light.

The use of antibody-dye conjugates with dyes that absorb in the spectral range of near-infrared light (NIR; 600-900 nm) makes possible, however, the detection of new vascular formation in deeper tissue layers (up to 1 cm), since NIR light is absorbed more weakly from tissue and therefore has a larger tissue penetration depth. The observation of fluorescence is visually impossible and can be carried out by CCD-cameras (charge-coupled device camera), which are placed over the tissue area of interest. Both macroscopic and microscopic detection are possible. The advantage of the use of dyes in the antibody-dye conjugates, which absorb and fluoresce in the NIR-spectral range, then is at work if an evaluation of masked areas (e.g., by blood) is necessary.

From the photophysical standpoint, those dyes that have an absorption maximum within the spectral range of 400 to 800 nm and at least one fluorescence maximum within 500 to 900 nm are suitable for antibody-dye conjugates.

The subjects of this invention are also antibody-dye conjugates that are characterized in

that the dye induces a fluorescence signal only with use of a defined wavelength range of the visible or near-infrared light.

Antibody-dye conjugates that comprise dyes with visually detectable fluorescence are, for example, those from the following classes:

fluorescein, fluorescein-isothiocyanate, carboxyfluorescein or calcein, tetrabromofluoresceins or eosins, tetraiodofluoresceins or erythrosins, difluorofluorescein, such as, e.g., Oregon Green<sup>TM</sup> 488, Oregon Green<sup>TM</sup> 500 or Oregon Green<sup>TM</sup> 514, carboxyrhodol (Rhodol Green<sup>TM</sup>) dyes (US 5,227,487; US 5,442,045), carboxyrhodamine dyes (e.g., Rhodamine Green<sup>TM</sup> dyes) (US 5,366,860),

4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, such as, e.g., Bodipy FL, Bodipy 493/503 or Bodipy 530/550 and derivatives thereof (US 4,774,339, US 5,187,288, US 5,248,782, US 5,433,896 and US 5,451,663),

cyanine dyes, especially carbocyanines and merocyanines, coumarin dyes, such as, e.g., 7-amino-4-methylcoumarin, metal complexes of DTPA or tetraazamacrocyclene (cyclene, pycene) with terbium or europium or tetrapyrrole dyes, especially porphyrins.

Antibody-dye conjugates that comprise near-infrared dyes are, for example, those from the following classes:

polymethine dyes, such as dicarbocyanine, tricarbo-cyanine, merocyanine and oxonol dyes (WO 96/17628),

rhodamine dyes,

phenoxazine or phenothiazine dyes,

tetrapyrrole dyes, especially benzoporphyrins, chorines and phthalocyanines.

Preferred near-infrared dyes in the antibody-dye conjugates are the cyanine dyes with absorption maxima of between 700 and 800 nm, especially indodi- and indotricarbocyanines.

Generally preferred are dyes in the antibody-dye conjugates from the above-mentioned classes, which have one or more carboxyl groups and which are coupled to amino groups of antibodies or antibody fragments after chemical activation. Those derivatives that contain



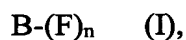
maleimido or bromoalkyl radicals are also preferred, so that a covalent coupling to the sulfhydryl group of the amino acid cysteine is carried out.

In addition, dyes that have isothiocyanate groups, which also react with amino groups, are preferred.

Moreover, the dyes in the antibody-dye conjugates must have a high photostability and must not bleach out under irradiation with light (photobleaching) to ensure a constant signal within the study period.

The subjects of this invention are thus antibody-dye conjugates that preferably accumulate in the edge area of the cell tissue of a focus of disease and thus make the edge area of the focus of disease optically detectable.

In particular subjects of this invention are antibody-dye conjugates of general formula I



in which

B stands for an antibody or an antibody fragment with high binding to ED-BFN,

F stands for a dye from the class of coumarins, fluoresceins, carboxyfluoresceins, difluorofluoresceins, tetrabromofluoresceins, tetraiodofluoresceins, rhodamines, carboxyrhodamines, carboxyrhodols, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacenes, polymethine dyes or tetrapyrrole dyes, or the terbium or europium complexes with DTPA or cyclene and its derivatives, and

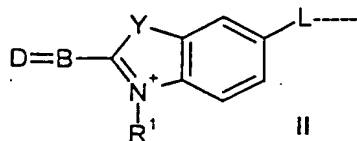
n stands for 1 to 5.

Especially preferred and thus also the subjects of this invention are antibody-dye conjugates, whose dye is a cyanine dye, a merocyanine dye, an oxonol dye, a styryl dye or a squarilium dye.

Especially preferred and thus also subjects of this invention are antibody-dye conjugates in which the dye portion is a cyanine dye, especially a carbocyanine, dicarbocyanine or tricarbocyanine.

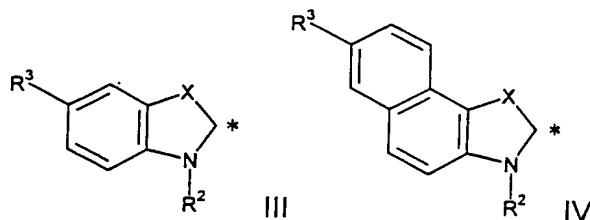
The invention thus relates in particular to those antibody-dye conjugates in which dye -

(F)<sub>n</sub> of general formula I is a cyanine dye of general formula II



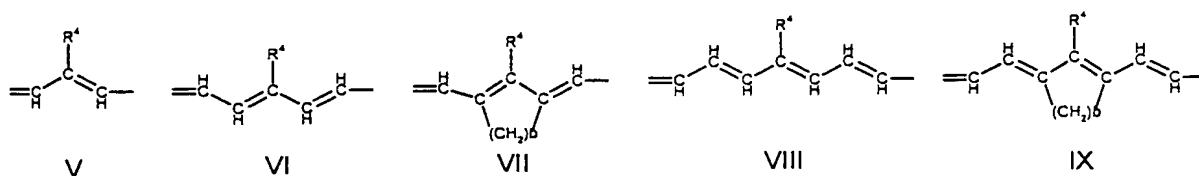
in which

D stands for a radical III or IV



whereby the position labeled with a star means the interface site with radical B,  
and

B can stand for group V, VI, VII, VIII or IX



in which

R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> mean C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-sulfoalkyl, a saturated or unsaturated, branched or linear C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>-alkyl chain, which optionally can be substituted with up to 15 oxygen atoms, and/or with up to 3 carbonyl groups, and/or with up to 5 hydroxy groups,  
R<sup>3</sup> stands for group -COOE<sup>1</sup>, -CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>, -NHCOE<sup>1</sup>, -NHCONHE<sup>1</sup>,

$-\text{NE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{OE}^1$ ,  $-\text{OSO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$  or  $-\text{E}^1$ , whereby

$\text{E}^1$  and  $\text{E}^2$ , independently of one another, stand for a hydrogen atom,  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -sulfoalkyl, saturated or unsaturated, branched or straight-chain  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{50}$ -alkyl, which optionally is interrupted with up to 15 oxygen atoms, and/or up to 3 carbonyl groups, and/or can be substituted with up to 5 hydroxy groups,

$\text{R}^4$  stands for a hydrogen atom or a fluorine, chlorine, bromine or iodine atom,

$b$  stands for 2 or 3,

$X$  stands for oxygen, sulfur or the group  $=\text{C}(\text{CH}_3)_2$  or  $-(\text{CH}=\text{CH})-$ , and

$L$  stands for a direct bond or a linker, which is a straight-chain or branched carbon chain with up to 20 carbon atoms, which can be substituted with one or more  $-\text{OH}$ ,  $-\text{COOH}$ , or  $\text{SO}_3$  groups and/or optionally can be interrupted in one or more places by an  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{CS}-$ ,  $-\text{CONH}-$ ,  $-\text{NHCO}-$ ,  $-\text{NHCSNH}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $\text{PO}_4-$  or an  $-\text{NH}$  group or an aryl ring.

The antibody-dye conjugates according to the invention can be used either alone or in a formulation as pharmaceutical agents.

To use the antibody-dye conjugates as pharmaceutical agents, the latter are brought into the form of a pharmaceutical preparation, which in addition to the antibody-dye conjugate contains pharmaceutical, organic or inorganic inert media that are suitable for enteral or parenteral administration, such as, for example, water, gelatin, gum arabic, lactose, starch, magnesium stearate, talc, vegetable oils, polyalkylene glycols, etc. The pharmaceutical preparations can be present in solid form, for example as tablets, coated tablets, suppositories, capsules or in liquid form, for example as solutions, suspensions or emulsions. They optionally contain, moreover, adjuvants such as preservatives, stabilizers, wetting agents or emulsifiers, salts for altering the osmotic pressure or buffers.

For parenteral use, injection solutions or suspensions, especially aqueous solutions of antibody-dye conjugates, are suitable.

As vehicle systems, surface-active adjuvants, such as salts of bile acids or animal or plant phospholipids, but also mixtures of them as well as liposomes or their components can also be used.

For oral use, especially tablets, coated tablets or capsules with talc and/or hydrocarbon vehicles or binders, such as, for example, lactose, corn or potato starch, are suitable. The application can also be carried out in liquid form, such as, for example, as juice, to which optionally a sweetener is added.

The dosage of the antibody-dye conjugates can vary depending on the method of administration, age and weight of the patient, type and severity of the disease to be treated and similar factors. The dose of the antibody-dye conjugates that can be administered for detecting limit areas is 0.5-1000 mg, preferably 50-200 mg, whereby the dose can be given as a single dose to be administered once or divided into two or more daily doses.

The above-described formulations and forms for dispensing are also the subjects of this invention.

The invention thus also relates to pharmaceutical agents that comprise one or more antibody-dye conjugates for intraoperative visualization of the edge areas of a focus of disease, whereby the pharmaceutical agents are used either alone or in a mixture with suitable solvents, buffers and/or vehicles.

The antibody-dye conjugates according to the invention are used in the surgical treatment of angiogenesis-dependent diseases, such as malignant tumors and metastases thereof, benign tumors, precancerous tissue changes, endometriosis, hemangiomas and ectopic pregnancies.

Also a subject of this invention is the use of antibody-dye conjugates and agents for intraoperative visualization of foci of disease, especially for microscopic and macroscopic, intraoperative visualization of edge areas of a focus of disease, as well as the use of antibody-dye conjugates for the production of an agent for surgical treatments of angiogenesis-dependent diseases, such as malignant tumors and metastases thereof, benign tumors, precancerous tissue changes, endometriosis, hemangiomas and ectopic pregnancies.

## **Production of Dyes**

The production of dyes is carried out according to methods that are known in the literature. Suitable dyes for the production of antibody-dye conjugates are dyes of carboxyl groups or isothiocyanate groups for covalent coupling to amino groups of the antibody. Especially preferred in this case are cyanine dyes (Mujumdar, S. R. et al. (1996) 7: 356-362; Flanagan, J. H. et al. (1997) 8: 751-756 and Licha, K. et al. (1996) Proc SPIE Vol. 2927, 192-198).

The dyes with carboxyl groups are activated first by conversion into a reactive ester (e.g., N-hydroxysuccinimide ester) according to methods that are known in the art. Dyes with isothiocyanate groups can be used directly. The reactive derivatives are then brought to reaction in buffer solution or mixtures of organic solvent (e.g., dimethylformamide (DMF) or dimethyl sulfoxide (DMSO)) and buffer solution with the antibody. In this case, a 3- to 100-fold molar excess of dye is used. The unreacted portion is separated by ultrafiltration and/or chromatography after the reaction is completed.

The following dye is also produced by a similar method:

### **Production Example 1**

#### **Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanine-5-carboxylic acid-N-hydroxysuccinimide ester**

The production of bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanine-5-carboxylic acid is carried out starting from 1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolenine and 1-(4-sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indolenine (Cytometry 10, 11-19, 1989, Talanta 39, 505-510, 1992) in a way similar to methods known in the literature.

For conversion into the N-hydroxysuccinimide ester, 0.1 mmol of dye (67 mg in 10 ml of DMF) is mixed in each case with 0.5 mmol of N-hydroxysuccinimide and dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and stirred for 24 hours at room temperature. After 50 ml of ether is added, the precipitated solid is filtered off, dissolved again twice each in a little DDF and precipitated with ether and finally dried in a vacuum (yield 89%).

### **Production of the Antibody-Dye Conjugate**

#### **Production of a bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanine conjugate with an L19-antibody**

The antibody L19 (1 mg in 1 ml of sodium acetate buffer 50 mmol, pH 8.2)) is mixed with N-hydroxysuccinimide ester (75  $\mu$ mol of a solution of 4 mg/ml in DMSO) and stirred for 2 hours at room temperature. Purification is done using gel filtration on PD10 cartridges (Pharmacia) and concentration is done using Centricon-10 tubes (Amicon) while obtaining a solution of about 1 mg/ml of antibody.

Absorption maximum: 555 nm

Fluorescence maximum: 582 nm.

The following example explains the biological usability of the antibody-dye conjugates according to the invention without limiting the latter to the sample application.

### **Sample Application 1**

#### **In-vivo Fluorescence Imaging on Tumor-Carrying Hairless Mice and Microscopic Ex-vivo Examination of the Tumor Tissue**

The imaging properties of the compounds according to the invention were examined in vivo after injection in tumor-carrying hairless mice. For this purpose, 0.1  $\mu\text{mol/kg}$  to 2  $\mu\text{mol/kg}$  of the substance is administered intravenously, and the concentration in the tumor region is observed in a period of 0 to 48 hours. The fluorescence of the substances is induced by irradiation of the animals with light of corresponding wavelength, which is produced monochromatically with a laser (diode laser, solid-state laser) or is filtered out by filter from the polychromatic emission of an Hg or Xe lamp. In the case of the compound that is described in production example 1, light from an Nd:YAG laser of wavelength 540 nm is used for excitation to stimulate the test animal, and the fluorescence radiation at a wavelength of  $>580$  nm is detected by an intensified CCD camera while obtaining whole-body-fluorescence images. In a parallel manner, the fluorescence is detected visually and photographically. Sections are prepared from the tumor material and studied by microscope (Zeiss Axiovert microscope with Cy3-filter set).

After injection of 1  $\mu\text{mol/kg}$  of the antibody-dye conjugate in F9-teratocarcinoma-carrying hairless mice mentioned in the production example, it was possible after four hours to detect an increased fluorescence signal in comparison to normal tissue based on whole-body-fluorescence images.

After preparation of the skin and the topmost tissue layers of the tumor, the fluorescence can be associated with the edge areas of the tumor. The microscopic evaluation of tumor sections produces an elevated fluorescence, which correlates with blood vessels of the tumor edge area.

## Claims

1. Antibody-dye conjugates, characterized in that they preferably accumulate in the edge area of the cell tissue of a focus of disease and thus make the edge area of the focus of disease optically detectable.

2. Antibody-dye conjugates according to claim 1, of general formula I



in which

B stands for an antibody or an antibody fragment with high binding to EDB-fibronectin,

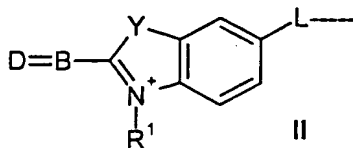
F stands for a dye from the class of coumarins, fluoresceins, carboxyfluoresceins, difluorofluoresceins, tetrabromofluoresceins, tetraiodofluoresceins, rhodamines, carboxyrhodamines, carboxyrhodols, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacenes, polymethine dyes or tetrapyrrole dyes, or the terbium or europium complexes with DTPA or cyclene and its derivatives, and

n stands for 1 to 5.

3. Antibody-dye conjugates according to claims 1 and 2, wherein the dye is a cyanine dye, a merocyanine dye, an oxonol dye, a styryl dye or a squarilium dye.

4. Antibody-dye conjugates according to claims 1 to 3, wherein the dye is a cyanine dye such as carbocyanine, dicarbocyanine or tricarbocyanine.

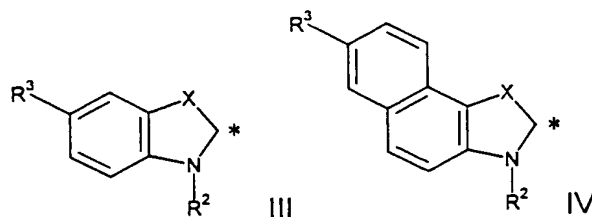
5. Antibody-dye conjugates according to claims 1 to 4, wherein dye  $-(F)_n$  of general formula I is a cyanine dye of general formula II



in which

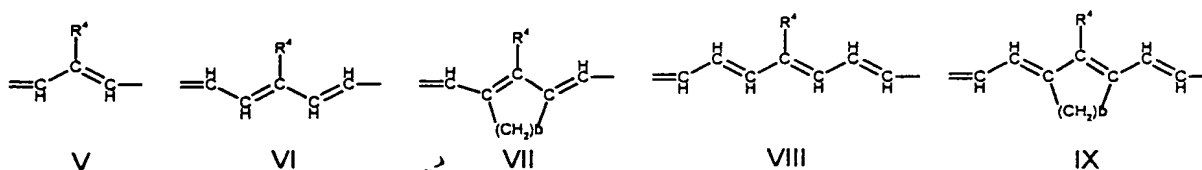


D stands for a radical III or IV



whereby the position labeled with a star means the interface site with radical B,  
and

B can stand for group V, VI, VII, VIII or IX



in which

$R^1$  and  $R^2$  mean  $C_1$ - $C_4$ -sulfoalkyl, a saturated or unsaturated, branched or linear  $C_1$ - $C_{50}$ -alkyl chain, which optionally can be substituted with up to 15 oxygen atoms, and/or with up to 3 carbonyl groups, and/or with up to 5 hydroxy groups,

$R^3$  stands for group  $-\text{COOE}^1$ ,  $-\text{CONE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{NHCOE}^1$ ,  $-\text{NHCONHE}^1$ ,  $-\text{NE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{OE}^1$ ,  $-\text{OSO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$  or  $-\text{E}^1$ ,

whereby

$E^1$  and  $E^2$ , independently of one another, stand for a hydrogen atom,  $C_1$ - $C_4$ -sulfoalkyl, saturated or unsaturated, branched or straight-chain  $C_1$ - $C_{50}$ -alkyl, which optionally is interrupted with up to 15 oxygen atoms, and/or up to 3 carbonyl groups, and/or

- can be substituted with up to 5 hydroxy groups,
- R<sup>4</sup> stands for a hydrogen atom or a fluorine, chlorine, bromine or iodine atom,
- b stands for 2 or 3,
- X stands for oxygen, sulfur or the group =C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> or -(CH=CH)-, and
- L stands for a direct bond or a linker, which is a straight-chain or branched carbon chain with up to 20 carbon atoms, which can be substituted with one or more -OH, -COOH, or SO<sub>3</sub> groups and/or optionally can be interrupted in one or more places by an -O-, -S-, -CO-, -CS-, -CONH-, -NHCO-, -NHCSNH-, -SO<sub>2</sub>-, PO<sub>4</sub>- or an -NH group or an aryl ring.

6. Antibody-dye conjugates according to claims 1 to 5, wherein antibodies L19 and E8 are used as antibodies.

7. Antibody-dye conjugates according to claims 1 to 6, wherein the dye in the visible spectral range of the light induces an optical signal.

8. Antibody-dye conjugates according to claims 1 to 6, wherein the dye induces a fluorescence signal only with use of a defined wavelength range of the visible or near-infrared light.

9. Pharmaceutical agent comprising one or more antibody-dye conjugates according to claims 1 to 8 for intraoperative visualization of the edge areas of a focus of disease.

10. Pharmaceutical agent according to claim 9, in a mixture with suitable solvents, buffers and/or vehicles.

11. Use of the antibody-dye conjugates and agents according to claims 1 to 10 for intraoperative visualization of foci of disease.

12. Use of antibody-dye conjugates according to claims 1 to 10 for intraoperative visualization of the edge areas of a focus of disease.

13. Use of antibody-dye conjugates according to claims 1 to 10 for microscopic and macroscopic intraoperative visualization of the edge areas of a focus of disease.

14. Use of antibody-dye conjugates according to claims 1 to 8 for the production of an agent for surgical treatment of angiogenesis-dependent diseases, such as malignant tumors and metastases thereof, benign tumors, precancerous tissue changes, endometriosis, hemangiomas and ectopic pregnancies.

**Abstract**

Antibody-dye conjugates that are suitable to bind newly-formed vessels to structures and their use for intraoperative visualization of pathological angiogenesis are described.

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 47 559.8

Anmeldetag: 24. September 1999

Anmelder/Inhaber: Schering Aktiengesellschaft, Berlin/DE

Bezeichnung: Antikörper-Farbstoffkonjugate gegen Zielstrukturen der Angiogenese zur intraoperativen Tumordarstellung

IPC: A 61 K, C 07 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 199 47 559.8

**Anmeldetag:** 24. September 1999

**Anmelder/Inhaber:** Schering Aktiengesellschaft, Berlin/DE

**Bezeichnung:** Antikörper-Farbstoffkonjugate gegen Zielstrukturen der Angiogenese zur intraoperativen Tumorranddarstellung

**IPC:** A 61 K, C 07 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident  
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT



## **Antikörper-Farbstoffkonjugate gegen Zielstrukturen der Angiogenese zur intraoperativen Tumorrandardarstellung**

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper-Farbstoffkonjugate, die geeignet sind an Strukturen neugebildeter Gefäße zu binden und deren Verwendung zur intraoperativen Darstellung der pathologischen Angiogenese.

10 Im erwachsenen Organismus findet bis auf wenige Ausnahmen (z. B. der Zyklus der gebärfähigen Frau) keine Neubildung von Gefäßen statt. Die Neubildung von Gefäßen ist jedoch bei vielen Erkrankungen zu beobachten. Der hier stattfindende Prozeß der Gefäßneubildung wird als Angiogenese bezeichnet und findet als Antwort auf bestimmte Signale statt.

- 15 Die Angiogenese ist ein Prozeß, der im Randbereich eines Krankheitsherdes bevorzugt stattfindet. Aus dem Zentrum des Krankheitsherdes werden Faktoren freigesetzt, die zum Randbereich des Krankheitsherdes diffundieren. Diese Faktoren werden auch als Angiogenesestimulatoren bezeichnet. Erreichen diese Angiogenesestimulatoren das gesunde Gewebe im Randbereich eines
- 20 Krankheitsherdes, werden bisher nicht in den Krankheitsherd einbezogene Gefäße stimuliert, neue Gefäßknospen zu bilden. Die von diesen Gefäßknospen auswachsenden Gefäße bilden ein neues Kapillargefäßnetz im Randbereich des Krankheitsherdes. Durch diesen Prozeß kann immer eine adäquate Nährstoffversorgung für den Krankheitsherd sichergestellt werden. Als besonders
- 25 wichtig hat sich herausgestellt, daß das Wachstum von Tumoren und deren Metastasen von der Fähigkeit abhängt, die Angiogenese zu induzieren.

Die chirurgische Therapie ist heute eine Standardmaßnahme zur Behandlung von lokalisierten Krankheitsherden. Große Bedeutung hat sie bei der Tumorbehandlung

30 erlangt. Es hat sich aber herausgestellt, daß trotz verbesserter chirurgischer Techniken die Zahl der lokalen Rezidive beträchtlich ist, da die anatomischen Gegebenheiten im menschlichen Organismus nur selten eine großräumige Entfernung der Krankheitsherde zulassen. In vielen Organen (z. B. im Gehirn) muß auf ein großräumiges Entfernen verzichtet werden, um gesundes Gewebe zu

erhalten. Das Risiko der Verletzung gesunder Organe steigt mit der Radikalität des chirurgischen Eingriffs.

Histologische Untersuchungen des Tumorrandbereiches nach erfolgter chirurgischer Tumorentfernung haben jedoch gezeigt, daß eine Vielzahl von Tumoren nicht vollständig entfernt werden können und Tumorreste im Körper verbleiben. Von diesen Tumorresten kann weiteres Tumorwachstum und auch die Tumormetastasierung ausgehen. Ein Verfahren, daß die Grenzen eines Krankheitsprozesses zum gesunden Gewebe während der chirurgischen Behandlung exakt darstellt, würde es erlauben, Krankheitsherde vollständig zu entfernen und das gesunde Gewebe weitgehend zu schonen.

Farbstoffe zur Darstellung von Krankheitsherden sind bereits bekannt (Poon WS et al., J Neurosurgery (1992) 76: 679-686, Haglund MM et al., Neurosurgery (1996) 38: 308-317). Sie werden vorzugsweise von Tumorzellen direkt aufgenommen oder reichern sich unspezifisch im extrazellulären Raum der Tumoren an. Da der Mechanismus der Anreicherung auch im gesunden Gewebe nachweisbar ist, ist die Spezifität und Empfindlichkeit der verwendeten Substanzen gering.

Verbindungen, die für die intraoperative Abgrenzung der Krankheitsherde durch selektive Darstellung des Randbereiches eines Krankheitsherdes verwendet werden können, sind bisher nicht bekannt.

Die Angiogenese findet im Randbereich von Krankheitsherden bevorzugt statt. Durch Darstellung der Angiogenese kann die Grenze zum gesunden Gewebe dargestellt werden. Antikörper zum Nachweis der Angiogenese im Krankheitsherd sind bereits bekannt und werden zur Darstellung von neugebildeten Gefäßen im histologischen Gewebeschnitt, zum Nachweis verschiedener Proteine im Krankheitsherd oder als Trägermoleküle für therapeutische Substanzen verwendet.

Nicht bekannt sind jedoch Antikörper in Kombination mit Farbstoffen, sogenannte Antikörper-Farbstoffkonjugate, die für die intraoperative Abgrenzung der Krankheitsherde durch selektive Darstellung des Randbereichs eines Krankheitsherdes zum Einsatz kommen können.



Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Antikörper-Farbstoffkonjugate für die intraoperative Tumorranddarstellung bereitzustellen. Die Antikörper der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate sind gegen Strukturen gerichtet, die spezifisch für den Prozeß der Angiogenese sind. Die erfindungsgemäßen

5 Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassen Farbstoffe, die durch ihre Anreicherung eine optisch Darzustellung ermöglichen.

Da die Angiogenese im Randbereich eines Krankheitsherd am stärksten ausgebildet ist, kommt es hier zum größten optischen Signal.

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate sind somit geeignet, die  
10 Grenze eines Krankheitsherd, den sogenannten Randbereich, zum gesunden Gewebe durch intraoperative, optische Diagnostik darzustellen. Hierdurch wird es ermöglicht, den Krankheitsherd bei weitgehender Schonung des gesunden Gewebes vollständig zu entfernen.

15 Es sind Antikörper bekannt, die gegen Moleküle gerichtet sind, die im angiogenetisch aktiven Gewebe stark exprimiert und im angrenzenden Gewebe nur auf sehr geringem Niveau exprimiert sind (WO 96/01653).

Von besonderem Interesse in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten sind Antikörper,  
20 die gegen die Rezeptoren für vaskuläre Wachstumsfaktoren gerichtet sind, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Entzündungsmediatoren binden, Rezeptoren auf Endothelzellen, an die Matrixmoleküle binden und Matrixproteine, die spezifisch bei der Gefäßneubildung exprimiert werden (Brekken et al., Cancer Res. (1998) 58: 552-9 und Schold SC Jr et al., Invest. Radiol. (1993) 28: 488-96).

25

Bevorzugt sind Antikörper oder Antikörperfragmente, die gegen das Matrixprotein EDB-Fibronectin gerichtet sind. EDB-Fibronectin (EDBFN), auch als onkofetales Fibronectin bekannt, ist eine Splicevariante des Fibronectins, das sich spezifisch um neugebildete Gefäße im Prozeß der Angiogenese bildet. Der besondere Vorteil von  
30 Antikörpern gegen das EDB-Fibronectin besteht darin, daß es durch intraoperative Verwundung bei der Entfernung des Krankheitsherd zu keiner Neubildung des EDB-Fibronectins im gesunden Gewebe kommt. Hierdurch bleibt die Spezifität während des chirurgischen Eingriffs erhalten. Antikörper gegen Wachstumsfaktorrezeptoren oder Entzündungsmediatoren auf der Endothelzelle, die

ebenfalls spezifisch im Tumorrandbereich exprimiert werden, können aber während des chirurgischen Eingriffs auch im gesunden Gewebe in der Nähe des Krankheitsherdes neugebildet werden.

- 5 Besonders bevorzugt im erfinderischen Antikörper-Farbstoffkonjugat sind die Antikörper L19 und E8 gegen das EDB-Fibronectin (Viti F et al, Cancer Res (1999) 59: 347-352).

Solche Antikörper-Farbstoffkonjugate sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10

Die bekannten Antikörper werden mit Farbstoffen konjugiert, deren Anreicherung im Gewebe optisch detektiert werden kann und die intraoperativen Abgrenzung des Randbezirkes eines Krankheitsherdes ermöglicht.

- 15 Der Vorteil der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate besteht nun darin, daß diese für eine selektive Fluoreszenzanfärbung von Geweben in neoangiogenetischem Stadium zur Anwendung kommen können. Die Fluoreszenzanfärbung ist tumorspezifisch und liefert ein Fluoreszenzsignal, daß in hohem Signal-zu-Untergrund-Verhältnis detektiert werden kann.

20

Es sind auch Antikörper-Farbstoffkonjugate für die Fluoreszenzbildgebung zum Zwecke der perkutanen, nicht-invasiven Tumordarstellung bekannt (Neri D et al., Nature Biotechnology (1997) 15: 1271-1275).

- 25 Nicht bekannt jedoch sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich eines Krankheitsherdes bevorzugt anreichern.

Es sind auch Protein-Farbstoffkonjugate zur intraoperativen Tumordarstellung bekannt.

- 30 Nachteilig an diesen Konjugaten ist, daß insbesondere hypoxische als auch metabolisch unterversorgte Tumorzellen die Konjugate aufnehmen. Da das Gewebe im Randbereich von Tumoren aber gut vaskularisiert ist und hierdurch die Zellen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt sind, gelingt gerade hierdurch keine ausreichende Anreicherung der bekannten Protein-Farbstoffkonjugate.

Dagegen sind die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate von dem metabolischen Zustand des Krankheitsherdes weitgehend unabhängig.

- 5 Obwohl die optische Erfassung der Grenzen eines Krankheitsherdes auf unterschiedliche Weise erfolgen kann, wird generell die Erfassung der durch entsprechendes Anregungslicht induzierten, farbstoffspezifischen Fluoreszenzstrahlung bevorzugt. Je nach Emissionswellenlänge kann dabei die Fluoreszenz direkt makroskopisch oder mikroskopisch visuell erfaßt werden und  
10 gegebenenfalls dabei gleichzeitig durch bildgebende Detektionssysteme digital aufgezeichnet und auf einem Bildschirm dargestellt werden.

- Visuell erfaßbar ist Fluoreszenzstrahlung des Spektralbereiches 400 bis 650 nm. Besonders bevorzugt ist eine Wellenlänge von 450 bis 600 nm. Der besondere  
15 Vorteil der Verwendung des sichtbaren Bereiches des Lichtes besteht darin, daß die Detektion der Fluoreszenz durch geringen technischen Aufwand möglich ist. Anregungslicht, das durch geeignete Laser oder Laserdioden erzeugt wird, wird in einen Lichtleiter eingekoppelt und über diesen an das zu diagnostizierende Areal herangeführt. Die Durchführung der introoperativen Tumorranderkennung erfolgt  
20 durch großflächige Bestrahlung des Areals. Durch einen Filter (z. B. eine Filterbrille, die durch die untersuchende Person getragen wird) wird das reflektierte Anregungslicht abgeblockt und nur die farbstoffspezifische Fluoreszenz beobachtet (makroskopische Beobachtung). Alternativ kann die Erfassung der Fluoreszenz  
25 durch ein Operationsmikroskop erfolgen (mikroskopische Beobachtung). Durch die geringe Eindringtiefe von VIS-Licht in Gewebe (wenige Millimeter) können auf diese Weise oberflächlich lokalisierte Gefäßneubildungen erfaßt werden.

- Ein weiterer Vorteil des Spektralbereiches des sichtbaren Lichtes besteht in der geringen Eindringtiefe in das Gewebe und Emission aus dem Gewebe. Hierdurch wird  
30 das detektierbare Signal nicht durch Signale aus tieferen Gewebsanteilen verfälscht und kann den oberflächlich sichtbaren Gewebsstrukturen genau zugeordnet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Antikörper-Farbstoffkonjugate, deren Farbstoffe im sichtbaren Spektralbereich des Lichtes ein optisches Signal induzieren.

Die Verwendung von Antikörper-Farbstoffkonjugaten mit Farbstoffen, die im  
 5 Spektralbereich des Nahinfrarotlichtes (NIR; 600 – 900 nm) absorbieren, ermöglicht dagegen die Erkennung von Gefäßneubildung in tieferen Gewebeschichten (bis zu 1 cm), da NIR-Licht schwächer von Gewebe absorbiert wird und daher eine größere Gewebeeindringtiefe besitzt. Die Beobachtung der Fluoreszenz ist visuell nicht  
 10 möglich und kann durch CCD-Kameras (charge coupled device-Kamera) erfolgen, die über dem interessierenden Gewebeareal platziert sind. Sowohl die makroskopische als auch mikroskopische Erfassung ist möglich. Der Vorteil der Verwendung von Farbstoffen in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten, die im NIR-Spektralbereich absorbieren und fluoreszieren, kommt dann zum tragen, wenn eine Beurteilung verdeckter Areale (z. B. durch Blut) erforderlich ist.

15 Aus photophysikalischer Sicht sind für die Antikörper-Farbstoffkonjugate solche Farbstoffe geeignet, die ein Absorptionsmaximum innerhalb des Spektralbereiches von 400 bis 800 nm und mindestens ein Fluoreszenzmaximum innerhalb 500 bis 900 nm besitzen.

20 Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, die dadurch gekennzeichnet sind, daß der Farbstoff erst unter Verwendung eines definierten Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder  
 nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.

25 Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassend Farbstoffe mit visuell erfaßbarer Fluoreszenz, sind beispielsweise solche aus folgenden Klassen:  
 Fluorescein, Fluorescein-isothiocyanat, Carboxyfluorescein oder Calcein, Tetrabromfluoresceine oder Eosine, Tetraiodfluoresceine oder Erythrosine,  
 30 Difluorofluorescein, wie z. B. Oregon Green™ 488, Oregon Green™ 500 oder Oregon Green™ 514, Carboxyrhodol (Rhodol Green™)-Farbstoffe (US 5,227,487; US 5,442,045), Carboxyrhodamin-Farbstoffe (z. B. Rhodamine Green™ Dyes) (US 5,366,860),

4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, wie z. B. Bodipy FL, Bodipy 493/503 oder Bodipy 530/550 und Derivate davon (US 4,774,339, US 5,187,288, US 5,248,782, US 5,433,896, US 5,451,663),

Cyaninfarbstoffe, insbesondere Carbocyanine und Merocyanine, Coumarinfarbstoffe, wie z. B. 7-Amino-4-methylcoumarin, Metallkomplexe von DTPA oder Tetraaza-macrozyklen (Cyclen, Pyclen) mit Terbium oder Europium oder Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Porphyrine.

Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassend Nahinfrarotfarbstoffe, sind beispielsweise solche aus folgenden Klassen:

Polymethinfarbstoffe, wie Dicarbocyanin-, Tricarbocyanin-, Merocyanin- und Oxonolfarbstoffe (WO 96/ 17628),

Rhodaminfarbstoffe,

Phenoxazin- oder Phenothiazinfarbstoffe,

Tetrapyrrolfarbstoffe, insbesondere Benzoporphyrine, Chlorine und Phthalocyanine.

Bevorzugte Nahinfrarotfarbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten sind die Cyaninfarbstoffe mit Absorptionsmaxima zwischen 700 und 800 nm, insbesondere Indodi- und Indotricarbocyanine.

Generell bevorzugt sind Farbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten aus o. g. Klassen, die eine oder mehrere Carboxylgruppen besitzen, welche nach chemischer Aktivierung an Aminogruppen von Antikörpern oder Antikörperfragmenten gekoppelt werden. Auch sind solche Derivate bevorzugt, die Maleimido- oder Bromalkylreste enthalten, so daß eine kovalente Kopplung an die Sulfhydrylgruppe der Aminosäure Cystein erfolgt.

Weiterhin sind Farbstoffe bevorzugt, die Isothiocyanat-Gruppen besitzen, welche ebenfalls mit Aminogruppen reagieren.

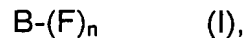
Darüber hinaus müssen die Farbstoffe in den Antikörper-Farbstoffkonjugaten eine hohe Photostabilität besitzen und unter Bestrahlung mit Licht nicht ausbleichen (Photobleaching), um innerhalb des Untersuchungszeitraums ein konstantes Signal zu gewährleisten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit Antikörper-Farbstoffkonjugate, die sich im Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherdes bevorzugt

anreichern und damit den Randbereich des Krankheitsherdes optisch darstellbar machen.

Insbesondere Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-

5 Farbstoffkonjugate der allgemeinen Formel I



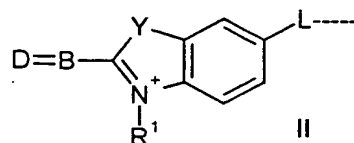
in der

- 10 B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher Bindung an ED-BFN steht,
- F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der Fluoresceine, Carboxyfluoresceine, der Difluorofluoresceine, der Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine, der Carboxyrhodamine, der Craboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, der
- 15 Polymethinfarbstoffe oder der Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe mit DTPA oder Cyclen und dessen Derivaten steht und
- n für 1 bis 5 steht, bedeuten.

- 20 Besonders bevorzugt und damit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, deren Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein Merocyaninfarbstoff, ein Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein Squariliumfarbstoff ist.

- 25 Insbesondere bevorzugt und damit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Antikörper-Farbstoffkonjugate, in denen der Farbstoffanteil ein Cyaninfarbstoff, insbesondere ein Carbocyanin, Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.

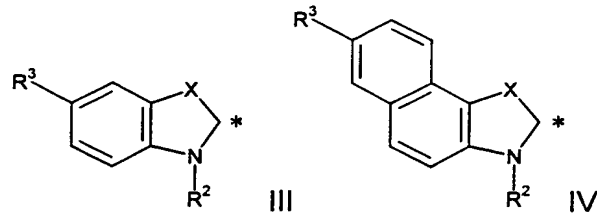
- Die Erfindung betrifft somit insbesondere solche Antikörper-Farbstoffkonjugate, in
- 30 denen der Farbstoff  $-(F)_n$  der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II



ist, in der

D

für einen Rest III oder IV



5

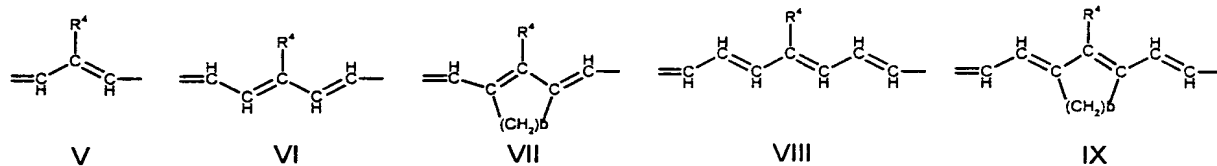
steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem

Rest B bedeutet, und

B

für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX

10



stehen kann, in denen

R¹ und R²

C₁-C₄-Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder lineare C₁-C₅₀-Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu 15

15

Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,

R³

für die Gruppe -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹ oder -E¹ steht, wobei

E¹ und E²

unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom, C₁-C₄-Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder geradkettiges C₁-C₅₀-Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,

20

R⁴

für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor- Chlor, Brom- oder Iodatome steht,

25

b

für 2 oder 3 steht,

- X für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe  $=C(CH_3)_2$  oder  $-(CH=CH)-$  steht,  
und
- L für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine geradkettige oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen, welche mit einer oder mehreren  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $SO_3$ -Gruppen substituiert, und/oder gegebenenfalls ein oder mehrfach durch eine  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-CO-$ ,  $-CS-$ ,  $-CONH-$ ,  $-NHCO-$ ,  $-NHCSNH-$ ,  $-SO_2-$ ,  $PO_4^-$  oder eine  $-NH$ -Gruppen oder einen Arylring unterbrochen sein kann, steht.

10

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate können entweder alleine oder in Formulierung als Arzneimittel zur Anwendung kommen.

- Zur Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate als Arzneimittel werden diese in die Form eines pharmazeutischen Präparats gebracht, das neben dem Antikörper-Farbstoffkonjugat für die enterale oder parenterale Applikation geeignete pharmazeutische, organische oder anorganische inerte Trägermaterialien, wie zum Beispiel, Wasser, Gelatine, Gummi arabicum, Milchzucker, Stärke, Magnesiumstearat, Talk, pflanzliche Öle, Polyalkylenglykole usw. enthält. Die pharmazeutischen Präparate können in fester Form, zum Beispiel als Tabletten, Dragees, Suppositorien, Kapseln oder in flüssiger Form, zum Beispiel als Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen vorliegen. Gegebenenfalls enthalten sie darüber hinaus Hilfsstoffe wie Konservierungsmittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel oder Emulgatoren, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks oder Puffer.

25

Für die parenterale Anwendung sind Injektionslösungen oder Suspensionen, insbesondere wässrige Lösungen der Antikörper-Farbstoffkonjugate geeignet.

- Als Trägersysteme können auch grenzflächenaktive Hilfsstoffe wie Salze der Gallensäuren oder tierische oder pflanzliche Phospholipide, aber auch Mischungen davon sowie Liposome oder deren Bestandteile verwendet werden.

30

Für die orale Anwendung sind insbesondere Tabletten, Dragees oder Kapseln mit Talkum und/oder Kohlenwasserstoffträger oder -binder, wie zum Beispiel Lactose,



Mais- oder Kartoffelstärke, geeignet. Die Anwendung kann auch in flüssiger Form erfolgen, wie zum Beispiel als Saft, dem gegebenenfalls ein Süßstoff beigefügt ist. Die Dosierung der Antikörper-Farbstoffkonjugate kann je nach Verabfolgungsweg, Alter und Gewicht des Patienten, Art und Schwere der zu behandelnden Erkrankung und ähnlichen Faktoren variieren. Die anwendbare Dosis der Antikörper-Farbstoffkonjugate zur Erkennung der Grenzbereiche beträgt 0,5-1000 mg, vorzugsweise 50-200 mg, wobei die Dosis als einmal zu verabreichende Einzeldosis oder unterteilt in 2 oder mehreren Tagesdosen gegeben werden kann.

Die oben beschriebenen Formulierungen und Darreichungsformen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Somit betrifft die Erfindung auch pharmazeutische Mittel, die ein oder mehrere Antikörper-Farbstoffkonjugate umfassen, zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes, wobei die pharmazeutischen Mittel entweder alleine oder in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/ oder Trägerstoffen zur Anwendung kommen.

Die erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate kommen bei der chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen, extrauterinen Schwangerschaften zum Einsatz.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel zur intraoperative Darstellung von Krankheitsherden, insbesondere zur mikro- und makroskopischen, intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherdes, sowie die Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate zur Herstellung eines Mittels für chirurgische Behandlungen von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen Schwangerschaften.

## Herstellung der Farbstoffe

Die Herstellung der Farbstoffe erfolgt nach literaturbekannten Methoden. Geeignete Farbstoffe für die Herstellung der Antikörper-Farbstoffkonjugate sind Farbstoffe

- 5 Carboxylgruppen oder Isothiocyanatgruppen zur kovalenten Kopplung an Aminogruppen des Antikörpers. Besonders bevorzugt sind hierbei Cyaninfarbstoffe (Mujumdar SR et al. (1996) 7: 356-362; Flanagan JH et al. (1997) 8: 751-756 und Licha K et al. (1996) Proc SPIE Vol 2927, 192-198).
- 10 Die Farbstoffe mit Carboxylgruppen werden zunächst durch Überführung in einen reaktiven Ester (z. B. N-Hydroxysuccinimidester) nach an sich bekannten Methoden aktiviert. Farbstoffe mit Isothiocyanatgruppen können direkt eingesetzt werden. Die reaktiven Derivate werden dann in Pufferlösung oder Gemischen aus organischem Lösungsmittel (z. B. Dimethylformamid (DMF) oder Dimethylsulfoxid (DMSO)) und
- 15 Pufferlösung mit dem Antikörper zur Reaktion gebracht. Dabei wird ein 3 bis 100-facher molarer Überschuß an Farbstoff verwendet. Der nicht reagierte Anteil wird nach beendeter Reaktion durch Ultrafiltration und/oder Chromatographie abgetrennt.

In analoger Verfahrensweise wird auch folgender Farbstoff hergestellt:

20

### Herstellungsbeispiel 1

#### 25 Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-5-carbonsäure-N-hydroxysuccinimidester

Die Herstellung von Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-5-carbonsäure erfolgt ausgehend von 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-3*H*-indolenin und 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3*H*-indolenin (Cytometry 10, 11-19, 1989, Talanta 39, 505-30 510, 1992) in Anlehnung an literaturbekannte Methoden.

- 30 Zur Überführung in den N-Hydroxysuccinimidester wird 0,1 mmol Farbstoff (67 mg in 10 ml DMF) mit jeweils 0,5 mmol N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 ml Ether wird der ausgefallene Feststoff abfiltriert, erneut je zweimal in wenig DDF gelöst und
- 35 mit Ether gefällt und schließlich im Vakuum getrocknet (Ausbeute 89%).

## Herstellung des Antikörper-Farbstoffkonjugats

### Herstellung eines Bis-1,1'-(4-sulfobutyl)indocarbocyanin-Konjugates mit L19-Antikörper

5

Der Antikörper L19 (1 mg in 1 ml Natriumacetat-Puffer 50 mM, pH 8,2)) wird mit N-Hydroxysuccinimidester (75 µmol einer Lösung von 4 mg/ml in DMSO) versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Gelfiltration über PD10-Kartuschen (Pharmacia) und Aufkonzentration mittels Centricon-10 tubes

10 (Amicon) unter Erhalt einer Lösung von ca. 1 mg/ml Antikörper.

Absorptionsmaximum: 555 nm

Fluoreszenzmaximum: 582 nm.

15

Das nachfolgenden Beispiel erläutern die biologische Anwendbarkeit der erfindungsgemäßen Antikörper-Farbstoffkonjugate ohne diese auf die Anwendungsbeispiele zu beschränken.

## 5 Anwendungsbeispiel 1

In-vivo-Fluoreszenzbildgebung an tumortragenden Nacktmäusen und mikroskopische Ex-vivo-Untersuchung des Tumorgewebes

- 10 Die bildgebenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen wurden in vivo nach Injektion in tumortragenden Nacktmäusen untersucht. Dazu wird 0,1  $\mu\text{mol/kg}$  bis 2  $\mu\text{mol/kg}$  der Substanz intravenös appliziert und die Anreicherung in der Tumorregion in einem Zeitraum von 0 bis 48 Stunden beobachtet. Die Fluoreszenz der Substanzen wird durch Bestrahlung der Tiere mit Licht entsprechender
- 15 Wellenlänge, das mit einem Laser (Diodenlaser, Festkörperlaser) monochromatisch erzeugt wird oder durch Filter aus der polychromatischen Emission einer Hg- oder Xe-Lampe herausgefiltert wird, induziert. Im Fall der im Herstellungsbeispiel 1 beschriebenen Verbindung wird aus einem Nd:YAG Laser Licht der Wellenlänge 540 nm zur Anregung zur Ausleuchtung des Versuchstieres verwendet und die
- 20 Fluoreszenzstrahlung bei einer Wellenlänge von  $>580\text{ nm}$  durch eine intensivierte CCD-Kamera unter Erhalt von Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen detektiert. Parallel wird die Fluoreszenz visuell und photographisch erfasst. Aus dem Tumormaterial werden Schnitte angefertigt und mikroskopisch untersucht (Zeiss Axiovert Mikroskop mit Cy3-Filtersatz).
- 25 Nach Injektion von 1  $\mu\text{mol/kg}$  des im Herstellungsbeispiel genannten Antikörper-Farbstoffkonjugates in F9-Teratökarzinomtragenden Nacktmäusen konnte nach 4 h ein erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Normalgewebe anhand von Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen detektiert werden.
- Nach Präparation der Haut und der obersten Gewebeschichten des Tumors kann die
- 30 Fluoreszenz den Randbereichen des Tumors zugeordnet werden. Die mikroskopische Beurteilung von Tumorschnitten ergibt eine erhöhte Fluoreszenz, die mit Blutgefäßen des Tumorrandbereiches korreliert.

## Patentansprüche

1. Antikörper-Farbstoffkonjugate, dadurch gekennzeichnet, daß sie sich im Randbereich des Zellgewebes eines Krankheitsherd des bevorzugt anreichern und damit den Randbereich des Krankheitsherd optisch darstellbar machen.

2. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß Anspruch 1, der allgemeinen Formel I



in der

B für einen Antikörper oder ein Antikörperfragment mit hoher Bindung an EDB-Fibronectin steht,

F für einen Farbstoff aus der Klasse der Coumarine, der Fluoresceine, Carboxyfluoresceine, der Difluorfluoresceine, der Tetrabromfluoresceine, der Tetraiodfluoresceine, der Rhodamine, der Carboxyrhodamine, der Carboxyrhodole, der 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-indacene, der Polymethinfarbstoffe oder der Tetrapyrrolfarbstoffe, oder der Terbium- oder Europiumkomplexe mit DTPA oder Cyclen und dessen Derivaten steht

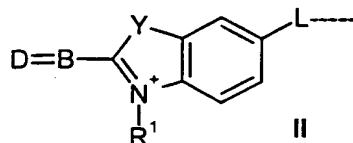
und

n für 1 bis 5 steht, bedeuten.

3. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff, ein Merocyaninfarbstoff, ein Oxonolfarbstoff, ein Styrylfarbstoff oder ein Squariliumfarbstoff ist.

4. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff ein Cyaninfarbstoff wie Carbocyanin, Dicarbocyanin oder Tricarbocyanin ist.

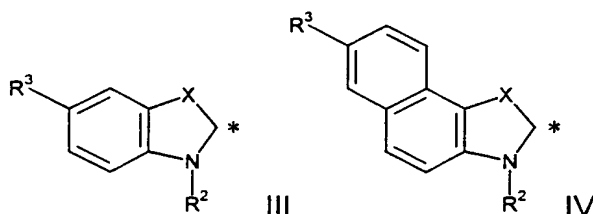
5. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff  $-(F)_n$  der allgemeinen Formel I ein Cyaninfarbstoff der allgemeinen Formel II



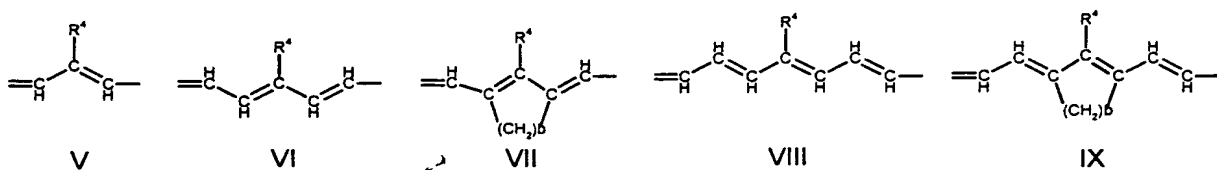
5

ist, in der

D für einen Rest III oder IV



- 10 steht, wobei die mit einem Stern markierte Position die Verknüpfungsstelle mit dem Rest B bedeutet, und
- B für die Gruppe V, VI, VII, VIII oder IX



15

stehen kann, in denen

- $R^1$  und  $R^2$   $C_1$ - $C_4$ -Sulfoalkyl, eine gesättigte oder ungesättigte, verzweigte oder lineare  $C_1$ - $C_{50}$ -Alkylkette bedeutet, die gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder mit bis zu 3 Carbonylgruppen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,
- $R^3$  für die Gruppe  $-\text{COOE}^1$ ,  $-\text{CONE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{NHCOE}^1$ ,  $-\text{NHCONHE}^1$ ,  $-\text{NE}^1\text{E}^2$ ,  $-\text{OE}^1$ ,  $-\text{OSO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_3\text{E}^1$ ,  $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$  oder  $-\text{E}^1$  steht, wobei

20

$E^1$  und  $E^2$  unabhängig voneinander für ein Wasserstoffatom,  $C_1$ - $C_4$ -Sulfoalkyl, gesättigtes oder ungesättigtes, verzweigtes oder geradkettiges  $C_1$ - $C_{50}$ -Alkyl steht, das gegebenenfalls mit bis zu 15 Sauerstoffatomen, und/oder bis zu 3 Carbonylgruppen unterbrochen, und/oder mit bis zu 5 Hydroxygruppen substituiert sein kann,

$R^4$  für ein Wasserstoffatom oder ein Fluor- Chlor, Brom- oder Iodatome steht,

$b$  für 2 oder 3 steht,

$X$  für Sauerstoff, Schwefel oder die Gruppe  $=C(CH_3)_2$  oder  $-(CH=CH)-$  steht, und

$L$  für eine direkte Bindung oder einen Linker, der eine geradkettige oder verzweigte Kohlenstoffkette mit bis zu 20 Kohlenstoffatomen, welche mit einer oder mehreren  $-OH$ ,  $-COOH$ ,  $SO_3$ -Gruppen substituiert, und/ oder gegebenenfalls ein oder mehrfach durch eine  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-CO-$ ,  $-CS-$ ,  $-CONH-$ ,  $-NHCO-$ ,  $-NHCSNH-$ ,  $-SO_2-$ ,  $PO_4^-$  oder eine  $-NH$ -Gruppen oder einen Arylring unterbrochen sein kann, steht.

6. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Antikörper die Antikörper L19 und E8 verwendet werden.

7. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff im sichtbaren Spektralbereich des Lichtes ein optisches Signal induziert.

8. Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff erst unter Verwendung eines definierten Wellenlängenbereiches des sichtbaren oder nahinfraroten Lichtes ein Fluoreszenzsignal induziert.

9. Pharmazeutisches Mittel, umfassend ein oder mehrere Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd.
- 5 10. Pharmazeutisches Mittel gemäß Anspruch 9, in Mischung mit geeigneten Lösungsmitteln, Puffern und/ oder Trägerstoffen.
11. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate und Mittel gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur intraoperative Darstellung von Krankheitsherden.
- 10 12. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur intraoperativen Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd.
13. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur mikro- und makroskopischen, intraoperative Darstellung der Randbereiche eines Krankheitsherd.
- 15 14. Verwendung der Antikörper-Farbstoffkonjugate gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 zur Herstellung eines Mittels zur chirurgischen Behandlung von angiogeneseabhängigen Erkrankungen, wie malignen Tumoren und deren Metastasen, benignen Tumoren, präkanzeröse Gewebsveränderungen, Endometriose, Hämangiomen und extrauterinen Schwangerschaften.
- 20
- 25



## **Zusammenfassung**

Es werden Antikörper-Farbstoffkonjugate, die geeignet sind an Strukturen neugebildeter Gefäße zu binden und deren Verwendung zur intraoperativen

5 Darstellung der pathologischen Angiogenese beschrieben.